

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-137597

(43)公開日 平成5年(1993)6月1日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	府内整理番号	F I	技術表示箇所
C 12 Q 1/06		6807-4B		
G 01 N 27/327				
27/416				
	7235-2 J		G 01 N 27/ 30	3 5 5
	6923-2 J		27/ 46	3 0 1 N

審査請求 未請求 請求項の数7(全10頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平3-307694	(71)出願人	390022644 株式会社中塩酢店 愛知県半田市中村町2丁目6番地
(22)出願日	平成3年(1991)11月22日	(72)発明者	前田 滋 鹿児島県鹿児島市宇宿町1575-6
		(72)発明者	大木 章 鹿児島県鹿児島市鶴池2丁目28-4-803
		(72)発明者	佐藤 猛 岐阜県土岐市泉町久尻561-17
		(72)発明者	加藤 奈穂 愛知県知多郡阿久比町大字福住中田26-15
		(74)代理人	弁理士 平木 祐輔 (外2名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 BODの測定方法、測定装置及びそれらに用いる微生物

(57)【要約】

【構成】 クレブシエラ属に属する微生物を固定化した微生物膜からなる微生物電極を装着したフローセルに試料を流入させて溶存酸素の変化量を酸素電極で計測するBODの測定方法。

【効果】 本発明は試料中のBODを迅速かつ高精度に測定できる安定性と実用性に優れた測定方法である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 クレブシエラ属に属する微生物を固定化した微生物膜を使用することを特徴とするBODの測定方法。

【請求項2】 酸素電極とクレブシエラ属に属する微生物を固定化した微生物膜とからなる微生物電極を装着したフローセルに被試験液を流入させることを特徴とするBODの測定方法。

【請求項3】 クレブシエラ属に属する微生物がクレブシエラ・オキシトカである請求項1又は2記載の測定方法。

【請求項4】 酸素電極とクレブシエラ属に属する微生物を固定化した微生物膜とからなる微生物電極。

【請求項5】 クレブシエラ属に属する微生物がクレブシエラ・オキシトカである請求項4記載の微生物電極。

【請求項6】 請求項4又は5記載の微生物電極を装着したフローセルを具備したBOD測定装置。

【請求項7】 クレブシエラ・オキシトカに属する微生物で資化性が広く、砒素耐性を有する新菌株クレブシエラ・オキシトカ 12092株。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明はBODの測定方法、測定装置及びそれらに用いる新菌株に関する。更に詳しくは、酸素電極とクレブシエラ属に属する微生物を固定化した微生物膜とからなる微生物電極を装着したフローセルを具備したBOD測定装置を使用して、BODを測定する方法、装置及びそれらに用いる新菌株に関する。

【0002】

【従来の技術】現在、BODの測定は日本工業規格に定められた方法(工業排水試験法JIS K-0102-1972)に従って行われているが、この方法は測定に5日間を要するなどの問題点があり、このため、従来よりBODを測定する技術として微生物電極を使用する試みが種々検討されてきた。その中でも微生物電極の微生物膜に固定化する微生物としてはトリコスボロン・クタネウムや活性汚泥等が良く用いられている(特公昭61-7258号公報:鈴木周一編著、バイオセンサー 135~136頁、140~142頁(1989)講談社発行所)。また、測定する装置に関しては、微生物電極をフローセルに装着して使用する装置等が知られている(特開平3-123851号公報)。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、これまでBOD測定用として固定化微生物膜に使用されてきた微生物は、例えばトリコスボロン・クタネウムでは各種有機物質に対する資化スペクトルが狭く、二糖類等応答しない成分が存在することや、逆に、エチルアルコール等特定な物質に対して高感度に応答するなど、JIS規格によるBOD値との相関性が低い場合が多くあった。又、最初にBODを測定する際、固定化微生物膜が正常

な応答をするようになるまでに1~3日間のいわゆる活性化処理が必要であるなど、実用性に欠ける点があった。一方、活性汚泥を使用する場合は固定化した活性汚泥を常に安定に管理することが困難であり、また微生物膜を交換する度に固定化操作を行う必要があるなどの問題点があった。尚、いずれの微生物を使用する場合も測定試料中に砒素等いわゆる微生物に害作用を示す物質が高濃度で存在すると微生物が死滅し測定ができなくなるなどの問題が一面あった。

【0004】一方、装置に関しては、これまでのフローセルを用いた方法では、試料中に混入した気泡が排出されずにセル中に残留して測定値に影響を与えたり、1試料当たり測定に要する時間が20分程度必要であり、正確でかつリアルタイムにBODを測定するという期待には充分答えられるものではなかった。本発明のクレブシエラ属に属する菌株を固定化した微生物膜を使用した微生物電極は種々の有機化合物に対して幅広く応答を示し、JIS法によるBOD値と高い相関性を示す測定値が得られることや瓶型微小容量フローセルを使用することで短時間に測定できる等、優れた効果がある。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、前述した種々の問題を解決すべく鋭意研究した結果、クレブシエラ属に属する微生物が広く種々の有機物に対して資化性を示し、かつ、短時間の活性化処理で安定した活性を示す等、BOD測定に関して優れた性質を有することを見い出した。

【0006】また、フローセルを使用しないバッチ型測定法を利用することができるが、これらの微生物の性質を生かし、より迅速で、正確なBOD測定を可能とするためには、試料の滞留時間が短く、試料室(フローセル)の溶液交換が容易で温度制御も簡単に実行できる構造を有する微小容量フローセルを組み合わせて測定すること等が有効であると見い出した。

【0007】即ち、本発明の第1は、クレブシエラ属に属する微生物を固定化した微生物膜を使用することを特徴とするBODの測定方法であり、本発明の第2は、酸素電極とクレブシエラ属に属する微生物を固定化した微生物膜とからなる微生物電極であり、本発明の第3は、前記微生物電極を装着したフローセルを具備したBOD測定装置であり、本発明の第4は、クレブシエラ・オキシトカに属する微生物で資化性が広く、砒素耐性を有する新菌株クレブシエラ・オキシトカ 12092株である。

【0008】以下、本発明を詳細に説明する。本発明に用いる微生物としては、クレブシエラ属に属する微生物であれば特に制限はなく、例えば、クレブシエラ・オキシトカ JCM1665 (Klebsiella oxytoca JCM1665)、クレブシエラ・プランティコラ JCM7251 (Klebsiella planticola JCM7251)、クレブシエラ・オザエナエ JCM1663 (Klebsiella ozaenae JCM1663)

3) クレブシエラ・テリゲナ JCM1687 (*Klebsiella terrigena* JCM1687) などが挙げられる。更に、本発明者らはBOD測定に適した微生物を広く自然界より検索した結果、鹿児島県の土壤より分離した1菌株が広い資化性を有し、短時間の活性化処理でBODの測定ができるなどの実用的に優れた性質を持っていることを見い出した。

【0009】本菌株の菌学的性質を以下に記載する。

A. 形態学的性質

(1) 細胞の形及び大きさ： 桿菌で大きさは0.8~1. 10
 $2\text{ }\mu\text{m} \times 3\text{ }~\sim~ 6\text{ }\mu\text{m}$

(2) 細胞の多形成： なし

(3) 運動性： なし

(4) 孢子の有無： なし

(5) グラム染色性： 險性

(6) 抗酸性： なし

B. 培養的性質

(1) 肉汁寒天平板培養： 良く生育し、平滑な淡青灰色のコロニーを形成する。

【0010】

(2) 肉汁寒天斜面培養： 良く生育する

(3) 肉汁液体培養： 良く生育する

(4) ゼラチン穿刺培養： 液化せず

(5) リトマス・ミルク： 酸性化し凝固する

C. 生理学的性質

(1) 硝酸塩の還元： +

(2) 脱窒反応： +

(3) MRテスト： -

(4) VPテスト： +

(5) インドールの生成： +

(6) 硫化水素の生成： -

(7) デンプンの加水分解： -

(8) クエン酸の利用： -

(9) 無機窒素源の利用： +

(10) 色素の生成： -

(11) ウレアーゼ： +

(12) オキシダーゼ： -

(13) カタラーゼ： +

(14) 生育の範囲： 温度5~40°C pH4~9.5

(15) 酸素に対する態度： 通性嫌気性

(16) O-Fテスト： F (発酵型)

(17) 下記の糖類からの酸及びガスの生成

(1) L-アラビノース： + +

(2) D-キシロース： + +

(3) D-グルコース： + +

(4) D-マンノース： + +

(5) D-フラクトース： + +

(6) D-ガラクトース： + +

(7) 麦芽糖： + +

(8) ショ糖： + +

(9) 乳糖： + +

(10) トレハロース： + +

(11) D-ソルビット： + +

(12) D-マンニット： + +

(13) イノシット： + +

(14) グリセリン： + +

デンプン： - -

D. その他の性質

(1) β -ガラクトシダーゼ： +

(2) DNase -

20 (3) トリプトファンデアミナーゼ： -

(4) エスクリンの分解： +

(5) アルギニンの分解： -

(6) リジンの脱炭酸反応： +

(7) オルニチンの脱炭酸反応： -

(8) 硝素耐性： 硝素1000ppm

存在下で生育可。

【0011】以上の菌学的性質をもとに本菌株の分類学上の地位をバージェイズ・マニュアル・オブ・システムティック・バクテリオロジー第1巻 415~416頁、461~

30 465頁 (1984) (*Berger's Manual of Systematic Bacteriology Volume 1, 415-416, 461-465 (1984)*) の記載と比較したところ、クレブシエラ・オキシトカに属する新菌株であると同定し、クレブシエラ・オキシトカ 12092 (*Klebsiella oxytoca* 12092) と命名した。尚、本菌株は工業技術院微生物工業技術研究所に微工研条寄第3616号 (FERM BP-3616) として1991年10月22日に受託され国際寄託されている。

【0012】以下に本菌株の培養方法を記載する。本菌株の培養は通常の細菌の培養方法であればいずれでも使用できる。炭素源としては、ぶどう糖、麦芽糖、蔗糖、糖蜜等通常用いられるものを単独、又は組み合わせて用いることができる。窒素源としては、有機窒素含有物として各種アミノ酸、コーンスティーブリカ、マルツエキス、ペプトン、酵母エキス、肉エキス、尿素等をまた、無機窒素含有物としては塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウム等を単独又は組み合わせて用いることができる。

【0013】その他、ビタミン、ミネラル等の成分を適宜添加使用することができる。培養温度は好ましくは20 50 °C~40°C、更に好ましくは28°C~37°Cである。培養pHは

好ましくは4.5～9.0、更に好ましくは5.5～8.0である。培養方法は液体培養及び固体培養のいずれでも可能であるが、生育力の強い対数増殖期の菌体が望ましく、培養時間は、好気的に液体培養を行う場合には好ましくは10時間～72時間、更に好ましくは12時間～48時間である。固体培養を行う場合には好ましくは12時間～96時間、更に好ましくは24時間～72時間である。

【0014】培養終了後、公知の一般的方法にて菌体を得ることができるが、例えば遠心分離法により菌体を集めることができる。得られた菌体は蒸留水等で洗浄した後、固定化を行うが、固定化法には通常用いられる方法が使用でき、例えばメンブランフィルター（ボアサイズ0.45ミクロン以下）などの膜の間に固定化して用いると菌体の漏洩がなく安定した固定化微生物膜が得られる。

【0015】微生物の固定化に使用する膜は、菌体は通過しないが試料溶液中の酸素、有機物などの溶解成分が通過できる親水性の材質のものであればよく、1例を挙げればボアサイズが0.45ミクロン以下のアセチルセルロース膜、ニトロセルロース膜などが適している。また、微生物を2枚の膜の間に固定化する際には、できるだけ膜間の間隙を少なくし、密着した膜と膜の間に微生物が封入される状態を保つことで安定した応答が得られ、かつ酸素電極への密着性も高まるため酸素濃度変化に対する応答性も向上し望ましい。

【0016】本発明の微生物電極は上記固定化微生物膜と酸素電極とからなり、微生物膜は着脱可能なキャップなどにより酸素電極に密着固定されており、膜の交換が容易にできる。また、この微生物電極は通常使用されるフローセルであればいずれにも装着して利用できるが、本発明の微生物は試料溶液中の成分に対する応答が早く、かつ、検出感度が高いため少量の試料でのBOD測定が可能であり、従って測定時間の短縮化のためにフローセルの容置を1ml以下、更に好適には、0.3ml～0.6mlと微小にすることができる、また、試料中の酸素濃度については、必ずしも完全に酸素飽和とする必要はなく、

酸素濃度が一定した状態であればよい。

【0017】更に、フローセルを縦位置に配し、フローセル中を攪拌子で攪拌しながら下方より試料溶液を通じ、上方より排出する方法をとることにより、気泡などの微生物膜への付着や残留がなく安定した測定ができる。例えば、試料溶液を4ml/分で通過させた場合、30°Cでは、約5分で1試料の測定ができる。図1に本発明の微生物電極を示す。

【0018】酸素電極3に固定化微生物膜2を密着させ、キャップ1を外嵌して微生物電極8が構成されている。本発明のBOD測定方法によれば、試料中のBOD値を5分以内という極めて短時間に、かつ正確に測定できる。以下本発明の実験例を示す。

【0019】【実験例1】 培養

クレブシエラ・オキシトカ 12092 (FERM BP-3616) 株を下記の組成を含む滅菌した培地 100mlの入った500ml容三角フラスコに無菌的に接種し、30°Cにて24時間好気的条件下で液体振とう培養を行った。培養終了後、培養液を6000rpmで20分間遠心分離し菌体を集めた。その菌体に少量の滅菌蒸留水を加えて懸濁し、再度6000rpmで20分間遠心分離して洗浄を行った。その洗浄操作を3回繰り返し洗浄菌体150mg（乾重）を得た。培地組成

ポリペプトン	1%
酵母エキス	0.1%
塩化ナトリウム	0.5%
pH6.5	

【実験例2】 活性測定

実験例1で得られたクレブシエラ・オキシトカ 12092株の菌体及び同様の条件で培養した各種菌体のBOD標準液（グルコース、グルタミン酸ナトリウム水溶液 JIS K 0102記載。以下「BOD標準液」という）に対する酸素消費速度を測定した。

【0020】

【表1】

微 生 物 名	酸 素 消 費 速 度 (mgO ₂ /分/g 乾燥菌体)
クレブシエラ・オキシトカ 12092	4.3
クレブシエラ・オキシトカ JCM1665	4.0
クレブシエラ・オザイナエ JCM1663	3.8
クレブシエラ・プランティコラ JCM7251	3.2
クレブシエラ・テリゲナ JCM1687	3.5
トリコスボロン・クタネウム IF010466	2.1

BOD標準液(37ppm)を基質とした酸素消費速度

測定温度: 30°C

【0021】表1に示すように、クレブシエラ属に属する微生物はいずれもBOD標準液に対して活性を示し、中でもクレブシエラ・オキシトカ 12092株は最も高い酸素消費速度の応答を示した。

【実験例3】装置・測定例(標準曲線)

実験例1で得られたクレブシエラ・オキシトカ 12092の菌体 0.4mg(乾重)をポアサイズ 0.45μm のニトロセルロース膜(ミリボア社製メンブランフィルター HWPO2500)2枚の間に inser て周囲を接着し微生物を包括固定する以外の間隙が生じないように膜同士を接着させ菌体を包括固定し、固定化微生物膜を作製した。この固定化微生物膜を100mM リン酸バッファー(pH7.0)中に浸漬し、エアポンプで 100ml/分のばっ氣を3時間行って活性化した。活性化した固定化微生物膜を図2に示す装置に装着しBOD標準液の測定を行った。

【0022】装置の概略は次の通りである。試料ビン4から採取されたBOD溶液は、電磁弁5を通り、ポンプ6を経て、フローセル7に導かれる。フローセル7中はモーター10により攪拌子2で攪拌される。酸素電極3の

電極面にキャップ1で外嵌された固定化微生物膜2から構成される微生物電極8で検知された値はアンプ部13で増幅され、記録計14で記録される。測定を終了した試料は、排液槽11に入る。測定終了後、電磁弁5を切り替え洗浄液槽12より洗浄液を通じて、洗浄を行う。

【0023】本装置を使用して、各種濃度のBOD標準液の測定を行った結果、図3に示すように、BODの濃度とそれに応答する酸素電極の電圧変化量の間にはきわめて良い直線関係が得られた。次に、本装置において、反応槽の容量を種々変えて実験を行った。表2に結果を示すが、表中の標準液に対する測定値は図3で得られた標準曲線を基に電圧変化量をBOD濃度として換算した値で示した。表2の結果より容量1ml以下で充分測定が可能であった。容量が1mlより大きい場合は洗浄も含めた測定時間が長くかかり、0.3mlより小さい場合は、検出感度が低くなり正確な測定が困難であった。

【0024】

【表2】

		反応槽容量 (ml)							
		0.1	0.2	0.3	0.5	0.6	1.0	2.0	5.0
標準液に対する測定値 (ppm)	BOD 標準液濃度 22	10	18	21	21	22	23	21	22
	44	20	35	44	44	43	45	44	46
	66	50	58	65	66	67	66	67	66
	122	98	105	124	123	123	122	125	123
測定時間 (分)		2	3	4	4	5	5	15	20

測定時間は洗浄時間も含む。

【0025】〔実験例4〕 活性化時間の比較
実験例1の方法で培養して得られた各種微生物を実験例3と同様に固定化し、固定化微生物膜とした。これらの固定化微生物膜を100mM リン酸バッファー (pH7.0) 中に浸漬しエアポンプ 100ml/分のばっ気を行い経時的に図2に示す装置でBOD標準液の測定を行った。表3に示すようにトリコスボロン・クタネウムIFO 104*

* 66株では活性化に1~2日必要であるのに対して、クレブシェラ属に属する微生物、特にクレブシェラ・オキシトカ 12092株では3時間で活性化ができるという特長があった。

【0026】

【表3】

	ばっ気時間 (hr)							
	0	1	3	5	10	24	36	48
クレブシェラ・オキシトカ 12092	30	38	65	67	66	67	65	66
トリコスボロン・クタネウム IFO 10466	4	8	12	11	46	58	60	64

値は66ppm BOD標準液に対する測定値 (ppm)

【0027】〔実験例5〕 既知標準物質の測定例 (トリコスボロンとの比較)

実験例4のクレブシェラ・オキシトカ 12092株の固定化微生物膜とトリコスボロン・クタネウム株の固定化微生物膜を充分活性化し、各種標準物質に対する応答を測定し、5日間BOD法による測定値と比較した。微生物固定化膜の測定には、実験例3で使用した装置を用いBOD標準液で検量線を作製して行った。5日間BOD法はJIS K0102記載の方法に従って行った。

【0028】表4に示すようにクレブシェラ・オキシトカ 12092株の測定値は公定法である5日間BOD

法の測定値と良く一致しており、両者の相関係数は $r^2 = 0.993$ であった。また、トリコスボロン・クタネウム IFO 10466株では応答のみられなかった二糖類に対しても本発明のクレブシェラ・オキシトカ 12092株は応答を示し、逆にエチルアルコールに対してトリコスボロン・クタネウム IFO 10466株が5日間BOD法より高い測定値を与えるのに対して、クレブシェラ・オキシトカ 12092株は5日間BOD法とほぼ等しい値を示した。

【0029】

【表4】

標準物質	BOD (ppm)		
	本発明法	5日間法	トリコスロン・タケウム IFO 10466
グルコース	0.77	0.78	0.72
フルクトース	0.74	0.71	0.54
シュクロース	0.45	0.45	0.36
ラクトース	0.45	0.45	0.06
マルトース	0.53	0.50	0.03
グルタミン酸	0.56	0.56	0.70
グリシン	0.15	0.10	0.45
エタノール	0.95	0.93	2.90
酢酸	0.85	0.88	1.77

【0030】【実験例6】 硝素存在下での測定
実験例3と同様にして各種濃度のBOD溶液を硝素存在下で測定した。図4に結果を示すが、硝素濃度5000ppm存在下でもBOD濃度と酸素電極での電圧変化量の間に良好な直線関係が得られた。以上のように、本発明によれば、各種化合物のBOD測定が迅速にかつ正確にできることが明らかとなった。

【0031】次に、実施例をあげて説明するが、本発明はこの実施例に限定されるものではない。

【0032】

* 【実施例】 実廃液の測定例 (5日間法との比較)
図2に示す装置に実験例3で製造したクレブシェラ・オ
20 キシトカ 12092株の活性化した固定化微生物膜を
装着し、実際の各種廃液についてBODの測定を行った。比較として同じ試料について5日間BOD法で測定した。表5に示すように本発明によるBOD測定結果と公定法の5日間BOD法の測定結果は高い相関性があった。

【0033】
* 【表5】

排水試料	BOD (ppm)	
	5日間法	本発明法
養豚場	1940	1880
し尿処理放流水	24.2	20.0
浄化槽	25.7	28.2
自動車整備工場	52.6	49.0
養鶏試験場	30.3	33.8
食品製造業	49.3	39.4
水産加工業	45.6	45.2
温泉病院	60.9	60.0

【0034】

【発明の効果】 本発明によれば試料中のBODを迅速にかつ正確に測定できる。

【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明の微生物電極を示す図である。

【図2】 実験例3で用いた装置を示す図である。

【図3】 図2に示す装置を用いて各種濃度のBOD標 50 3 ... 酸素電極

準液を測定した結果を示す図である。

【図4】 図2に示す装置を用いて各種濃度のBOD標準液を硝素存在下で測定した結果を示す図である。

【符号の説明】

1 ... キャップ

2 ... 固定化微生物膜

3 ... 酸素電極

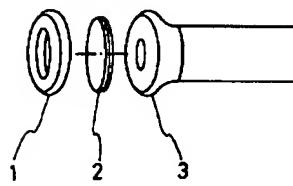
13

14

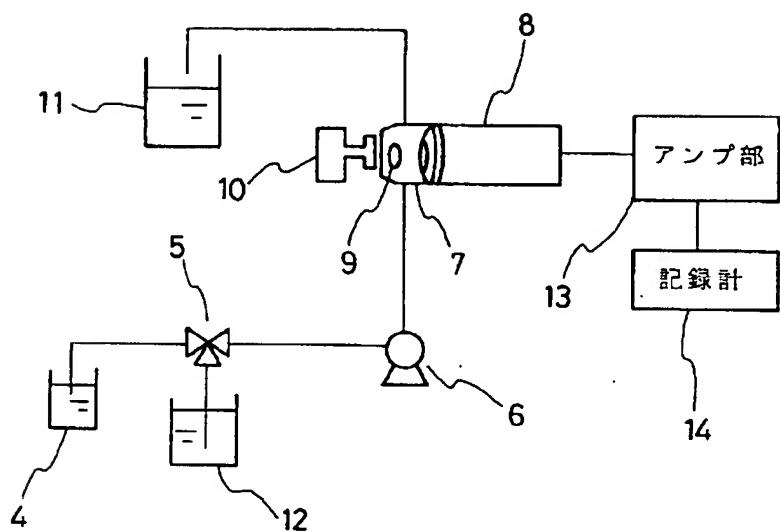
4 … 試料ピン
 5 … 電磁弁
 6 … ポンプ
 7 … フローセル
 8 … 微生物電極
 9 … 搅拌子

* 10 … モーター
 11 … 排液槽
 12 … 洗浄液槽
 13 … アンプ部
 14 … 記録計
 *

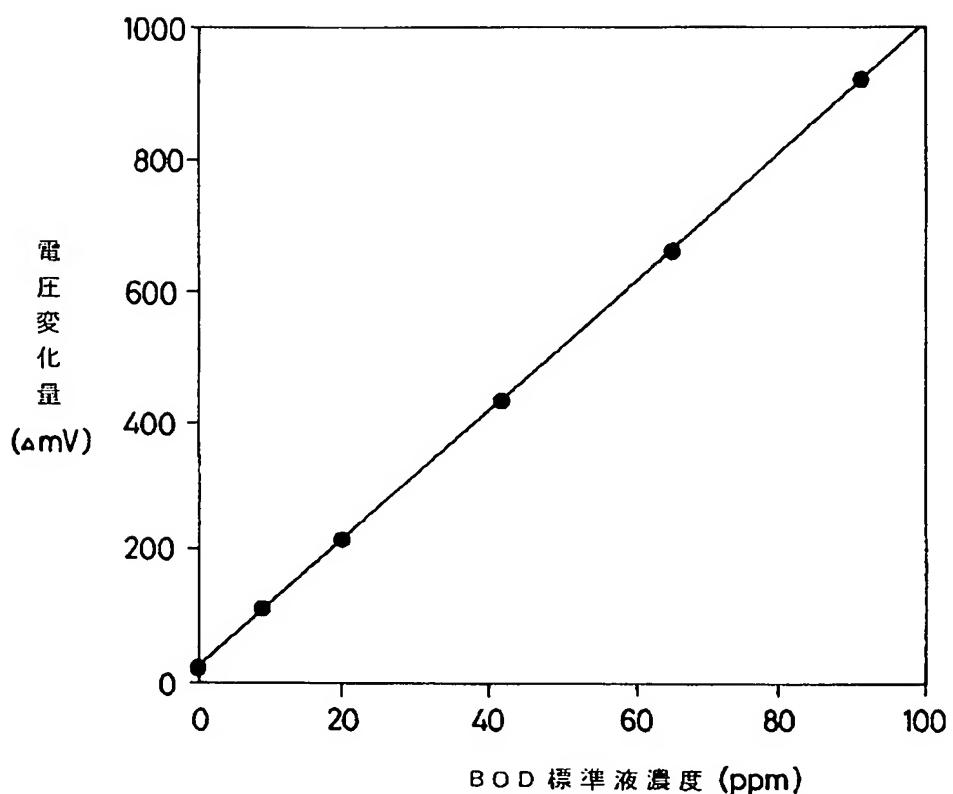
【図1】



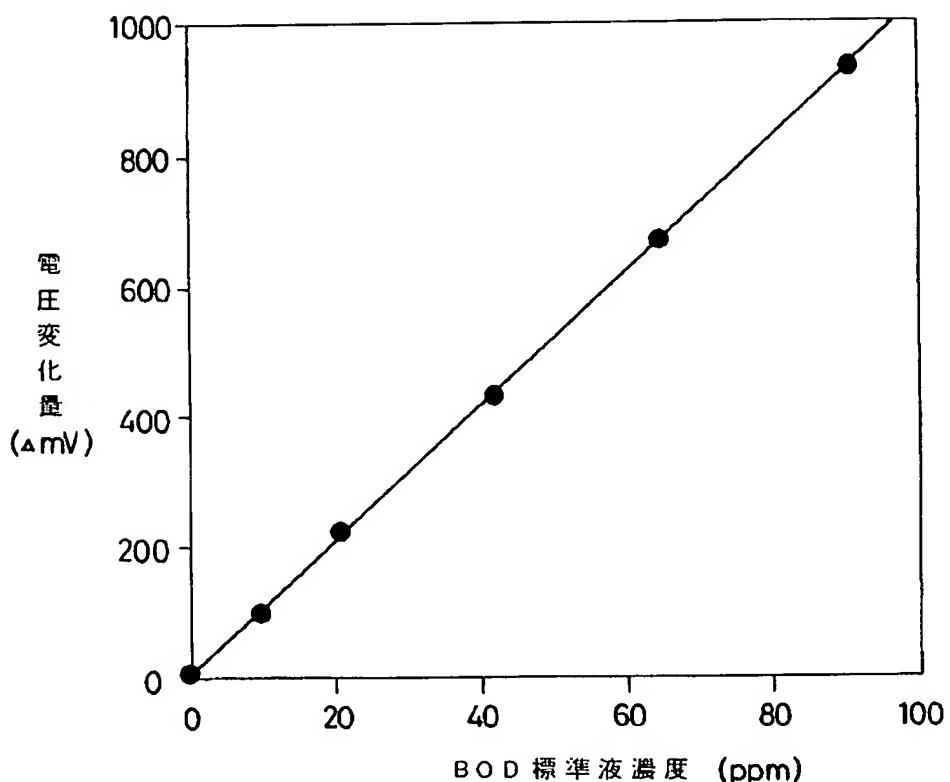
【図2】



【図3】



【図4】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.
 G 01 N 33/18
 // (C 12 Q 1/06
 C 12 R 1:22)

識別記号 105 庁内整理番号 9015-2J F I

技術表示箇所

(72)発明者 赤野 裕文
 愛知県半田市有脇町 2-46-28

(72)発明者 川村 吉也
 愛知県江南市古知野町古渡132

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 05-137597

(43)Date of publication of application : 01.06.1993

(51)Int.Cl.

C12Q 1/06

G01N 27/327

G01N 27/416

G01N 33/18

//(C12Q 1/06

C12R 1:22)

(21)Application number : 03-307694

(71)Applicant : NAKANO VINEGAR CO LTD

(22)Date of filing : 22.11.1991

(72)Inventor : MAEDA SHIGERU

OKI AKIRA

SATO TAKESHI

KATOU NAHO

AKANO HIROFUMI

KAWAMURA KICHIYA

(54) METHOD FOR MEASURING BOD, DEVICE FOR MEASURING THE SAME AND MICROORGANISM USED THEREFOR

(57)Abstract:

PURPOSE: To accurately and rapidly measure a BOD in a specimen after a short time activation treatment by employing a microorganismic membrane having immobilized microorganisms belonging to the genus Klebsiella as the microorganismic membrane constituting a microorganism electrode.

CONSTITUTION: A BOD is measured with a microorganismic membrane on which microorganisms belonging to the genus Klebsiella [preferably a new strain Klebsiella oxytoca 12092 (FERM-BP-3616)] have been immobilized. An acetyl cellulose membrane having a pore size of $\leq 45 \mu\text{m}$ is preferable as the membrane used for the immobilization. The measurement of the BOD is preferably carried out by mounting a microorganism electrode comprising the microorganismic membrane and an oxygen electrode in a flow cell, allowing a specimen to flow in the flow cell, and subsequently measuring the amount of the oxygen dissolved in the specimen with the oxygen

electrode.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 17.02.1998

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3051881

[Date of registration] 07.04.2000

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

* NOTICES *

JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.**** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] The measuring method of BOD characterized by using the microorganism film which fixed the microorganism belonging to Klebsiella.

[Claim 2] The measuring method of BOD characterized by making test fluid-ed flow into the flow cell equipped with the microbial electrode which consists of an oxygen electrode and microorganism film which fixed the microorganism belonging to Klebsiella.

[Claim 3] The measuring method according to claim 1 or 2 whose microorganism belonging to Klebsiella is Klebsiella oxytoca.

[Claim 4] The microbial electrode which consists of an oxygen electrode and microorganism film which fixed the microorganism belonging to Klebsiella.

[Claim 5] The microbial electrode according to claim 4 whose microorganism belonging to Klebsiella is Klebsiella oxytoca.

[Claim 6] The BOD measuring device possessing the flow cell equipped with a microbial electrode according to claim 4 or 5.

[Claim 7] New strain Klebsiella oxytoca which utilization nature is large by the microorganism belonging to Klebsiella oxytoca, and has arsenic resistance 12092 shares.

[Translation done.]

* NOTICES *

JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.**** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Industrial Application] This invention relates to the new strain used for the measuring method of BOD, a measuring device, and them. Furthermore, the BOD measuring device possessing the flow cell equipped with the microbial electrode which consists of an oxygen electrode and microorganism film which fixed the microorganism belonging to Klebsiella in detail is used, and it is related with the new strain used for the approach, the equipment, and them which measure BOD.

[0002]

[Description of the Prior Art] Measurement of BOD is current and the approach set to Japanese Industrial Standards. (waste-industrial-waters examining method JISK-0102-1972) Although carried out by following, this approach has troubles, like measurement takes five days, and, for this reason, the attempt which uses a microbial electrode as a technique which measures BOD conventionally has been examined variously. As a microorganism fixed on the microorganism film of a microbial electrode also in it, Trichosporon KUTANEUMU, active sludge, etc. are used well. (JP,61-7258,B; the work edited by Shuichi Suzuki, biosensor 135-136 pages, 140-142 pages (1989) Kodansha publishing office) . Moreover, about the equipment to measure, the equipment which equips with and uses a microbial electrode for a flow cell is known. (JP,3-123851,A) .

[0003]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] However, for example, in Trichosporon KUTANEUMU, the microorganism used for the immobilized microorganism film as an object for BOD measurement so far had the narrow utilization spectrum to various organic substances, and had many cases where functionality with that the component which does not answer [disaccharide] exists, and the BOD value by JIS, such as answering high sensitivity to matter [****], such as ethyl alcohol, conversely, was low. moreover, in case BOD is measured first, by the time the immobilized microorganism film comes to carry out a normal response, the so-called activation for one - three days is required -- etc. -- there was a point that practicality was missing. On the other hand, when using active sludge, it is difficult to always manage the fixed active sludge to stability, and there were troubles, like there is the need of performing fixed actuation whenever it exchanges the microorganism film. In addition, when which microorganism was used and the matter which shows a damage operation to the so-called

microorganisms, such as arsenic, existed by high concentration in the test portion, the microorganism became extinct and there was the first page of a problem of measurement becoming impossible etc.

[0004] It was not what can reply to expectation of remaining in a cel, without the air bubbles mixed into the sample making it discharging by the approach using an old flow cell, the time amount which measurement takes per one sample being the need about 20 minutes, and affecting measured value or on the other hand measuring [it is exact and] BOD on real time about equipment enough. The microbial electrode which used the microorganism film which fixed the strain belonging to Klebsiella of this invention has the outstanding effectiveness -- it can measure in a short time by using that the measured value which shows a response broadly to various organic compounds, and shows the BOD value by the JIS method and high functionality is obtained, and a vertical mold minute capacity flow cell.

[0005]

[Means for Solving the Problem] this invention persons found out having the property which was excellent about BOD measurement -- the activity which the microorganism belonging to Klebsiella showed utilization nature to the large various organic substance, and was stabilized in short-time activation is shown -- as a result of inquiring wholeheartedly that the various problems mentioned above should be solved.

[0006] Moreover, although the batch mold measuring method which does not use a flow cell can be used, in order to enable quicker and exact BOD measurement taking advantage of the property of these microorganisms, the residence time of a sample is short, and it is a sample room. (flow cell) Solution exchange was easy and it found out that it was effective to measure combining the minute capacity flow cell which has the structure where temperature control can also be performed easily etc.

[0007] It is the measuring method of BOD characterized by the 1st using the microorganism film which fixed the microorganism belonging to Klebsiella of this invention. Namely, the 2nd of this invention It is the microbial electrode which consists of an oxygen electrode and microorganism film which fixed the microorganism belonging to Klebsiella. The 3rd of this invention It is new strain Klebsiella oxytoca which is a BOD measuring device possessing the flow cell equipped with said microbial electrode, and the 4th has large utilization nature by the microorganism belonging to Klebsiella oxytoca of this invention, and has arsenic resistance. They are 12092 shares.

[0008] Hereafter, this invention is explained to a detail. If it is a microorganism belonging to Klebsiella as a microorganism used for this invention, there will be especially no limit. For example, Klebsiella oxytoca JCM1665 (Klebsiella oxytoca JCM1665), Klebsiella planticola JCM7251 (Klebsiella planticola JCM7251), Klebsiella OZAENAE JCM1663 (Klebsiella ozaenae JCM1663) and Klebsiella terrigena JCM1687 (Klebsiella terrigena JCM1687) etc. -- it is mentioned. Furthermore, this invention persons have utilization nature with 1 strain large as a result of searching the microorganism suitable for BOD measurement from a nature widely separated from the soil of Kagoshima Prefecture, and it found out having the property which was excellent practical [that measurement of BOD can be performed in short-time activation etc.]:

[0009] The mycology-property of a bacteria stock is indicated below.

A. Morphological property (1) The form and magnitude of a cell: Magnitude is 0.8-1.2 micrometers with a ** ** bacillus. x3-6micrometer(2) Pleiomorphia of a cell : It makes

and is (3). Maneuverability : It makes and is (4). Existence of a spore: It makes and is (5). Gram's stain nature: Electronegative (6) Acid-fast: Nothing B. Culture-property (1) Bouillon agar plate culture: It grows well and the colony of smooth light blue gray is formed.

[0010]

(2) Bouillon agar slant culture: (3) grown well Bouillon liquid culture : (4) grown well Gelatin stab culture: It does not liquefy but is (5). Litmus milk: C. acidified and solidified Physiological property (1) Reduction of a nitrate : + (2) Denitrification reaction : + (3) MR test : - (4) VP test : + (5) Generation of Indore: + (6) Generation of a hydrogen sulfide : - (7) Hydrolysis of starch: - (8) Use of a citric acid : - (9) Use of the source of inorganic nitrogen: + (10) Generation of coloring matter - (11) Urease : + (12) Oxidase : - (13) Catalase: + (14) Range of growth: Temperature of 5-40 degrees C pH 4-9.5 (15) Attitude against oxygen: a denominator -- an anaerobiosis --- (16) OF test: F --- ((fermentative type) 17) Generation of the acid from the following saccharide, and gas

	酸	ガス
(1) L-アラビノース :	+	+
(2) D-キシロース :	+	+
(3) D-グルコース :	+	+
(4) D-マンノース :	+	+
(5) D-フラクトース :	+	+
(6) D-ガラクトース :	+	+
(7) 麦芽糖 :	+	+
(8) ショ糖 :	+	+
(9) 乳糖 :	+	+
(10) トレハロース :	+	+
(11) D-ソルビット :	+	+
(12) D-マンニット :	+	+
(13) イノシット :	+	+
(14) グリセリン :	+	+
デンプン :	-	-

D. Other properties (1) Beta-galactosidase : + (2) DNase - (3) Tryptophan deaminase : - (4) Decomposition of the esculin : + (5) Decomposition of an arginine : -(6) Decarboxylation of a lysine: + (7) Decarboxylation of an ornithine: -(8) Arsenic resistance: Growth is possible under the 10000 ppm existence of arsenic.

[0011] He is the 1st volume of Bergey's Manual of Systematic Bacteriology about the status on the taxonomy of a bacteria stock based on the above mycology-property. 415-416 pages, 461-465 pages (1984) (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 1 and 415-416, 461-465 (1984)) The place compared with the publication, It identifies being the new strain belonging to *Klebsiella oxytoca*, and is *Klebsiella oxytoca*. It was named 12092 (*Klebsiella oxytoca* 12092). In addition, a bacteria stock is FERM BP No. 3616 to the Fermentation Research Institute, the Agency of Industrial Science and Technology. (FERM BP-3616) It carries out, and charge is taken on October 22, 1991 and international deposition is carried out.

[0012] The culture approach of a bacteria stock is indicated below. If culture of a

bacteria stock is the culture approach of the usual bacteria, either can use it. what is usually used [molasses / grape sugar, a maltose, sucrose,] as a carbon source — independence — or it can combine and use. independent [as an organic nitrogen inclusion / in various amino acid, corn steep liquor, a Malt extract, a peptone, a yeast extract, a meat extract, a urea, etc. / as an inorganic nitrogen inclusion / ammonium nitrate / an ammonium chloride, an ammonium sulfate,] as a nitrogen source again — or it can combine and use.

[0013] In addition, addition use of the components, such as a vitamin and a mineral, can be carried out suitably. 20 degrees C – 40 degrees C of culture temperature are 28 degrees C – 37 degrees C still more preferably. Culture pH — desirable — 4.5–9.0 — it is 5.5–8.0 still more preferably. Although either liquid culture or solid culture is possible for the culture approach, the fungus body of the strong logarithmic growth phase of viability is desirable, and culture time amount is 12 hours – 48 hours still more preferably preferably for 10 hours to 72 hours, when performing liquid culture aerobically. When performing solid culture, it is 24 hours – 72 hours still more preferably preferably for 12 hours to 96 hours.

[0014] After culture termination, although a fungus body can be obtained by the well-known general approach, fungus bodies can be collected, for example with a centrifuge method. the approach usually used for the fixing method although immobilization is performed after distilled water etc. washes the obtained fungus body — it can be used — for example, membrane filter (pore size of 0.45 microns or less) etc. — if it fixes and uses between film, the immobilized microorganism film which does not have leakage of a fungus body and was stabilized will be obtained.

[0015] If one example is given, pore size is [that the film used for immobilization of a microorganism should just be the thing of the quality of the material of a hydrophilic property which can pass dissolution components, such as oxygen in the sample solution, and the organic substance, although a fungus body is not passed] suitable for acetylcellulose membrane 0.45 microns or less, a nitrocellulose membrane, etc. Moreover, it improves [in case a microorganism is fixed between the film of two sheets / since the response stabilized by maintaining the condition that a microorganism is enclosed between the film and film which lessened the gap between film and were stuck is obtained and the adhesion to an oxygen electrode also increases / the responsibility over oxygen density change] as much as possible and is desirable.

[0016] The microbial electrode of this invention consists of the above-mentioned immobilized microorganism film and an oxygen electrode, adhesion immobilization of the microorganism film is carried out with a removable cap etc. at the oxygen electrode, and exchange of the film can be performed easily. Moreover, although this microbial electrode can be equipped with and used for all if it is a flow cell usually used Since early and detection sensitivity have the high response to the component in the sample solution, BOD measurement by a small amount of sample is possible for the microorganism of this invention. Therefore, what is necessary is just in the condition whose oxygen density could make minute 1ml or less of capacity of a flow cell with 0.3ml – 0.6ml still more suitably, and did not necessarily have to consider as oxygenation completely about the oxygen density in a sample, and was fixed for shortening of the measuring time.

[0017] Furthermore, measurement which there are no adhesion on the microorganism film and residual of air bubbles etc., and was stabilized can be performed by taking the

approach of discharging from the upper part through the sample solution from a lower part, allotting a flow cell to a vertical location and stirring the inside of a flow cell by the stirring child. For example, when the sample solution is passed by part for 4ml/, at 30 degrees C, measurement of one sample can be performed in about 5 minutes. The microbial electrode of this invention is shown in drawing 1.

[0018] The immobilized microorganism film 2 is stuck to an oxygen electrode 3, cap 1 is attached outside, and the microbial electrode 8 is constituted. according to the BOD measuring method of this invention, it says that the BOD value in a sample is less than 5 minutes -- very -- a short time -- and it can measure correctly. The example of an experiment of this invention is shown below.

[0019] [example 1 of an experiment] Culture Klebsiella oxytoca Culture medium which includes the following presentation for 12092 stock (FERM BP-3616) and which sterilized 100ml -- it entered The 500ml Erlenmeyer flask was inoculated in sterile and liquid shaking culture was performed under aerobic 24-hour conditions at 30 degrees C. It is 6000rpm after culture termination and about culture medium. At-long-intervals alignment separation was carried out for 20 minutes, and fungus bodies were collected. Little sterile distilled water is added and suspended in the fungus body, and it is 6000rpm again. It washed by carrying out at-long-intervals alignment separation for 20 minutes. It is 150mg (dry weight) of 3 times repeat washing fungus bodies about the washing actuation. It obtained. Medium composition poly peptone (a glucose, sodium glutamate water-solution JIS K0102 publication.) 1% yeast extract 0.1% sodium chloride 0.5% pH6.5 [the example 2 of an experiment] Klebsiella oxytoca obtained in the example 1 of an activity measurement experiment The BOD standard solution of the various fungus bodies cultivated on 12092 shares of fungus bodies, and the same conditions It is called the "BOD standard solution" below. The receiving oxygen consumption coefficient was measured.

[0020]

[Table 1]

微 生 物 名	酸 素 消 費 速 度 (mgO ₂ / 分 / g 乾燥菌体)
クレブシエラ・オキシトカ 12092	4.3
クレブシエラ・オキシトカ JCM1665	4.0
クレブシエラ・オゼナエ JCM1663	3.8
クレブシエラ・プランティコラ JCM7251	3.2
クレブシエラ・テリグナ JCM1687	3.5
トリコスパロン・タネウム IF010466	2.1

B O D 標準液(37ppm) を基質とした酸素消費速度

測定温度 : 30°C

[0021] The microorganism which belongs to Klebsiella as shown in Table 1 all shows

activity to the BOD standard solution, and is *Klebsiella oxytoca* especially. 12092 shares showed the response of the highest oxygen consumption coefficient.

[Example 3 of an experiment] Equipment and example of measurement (standard curve) *Klebsiella oxytoca* obtained in the example 1 of an experiment 12092 fungus bodies 0.4mg (dry weight) Pore size 0.45micrometer Nitrocellulose membrane (membrane filter [by Millipore Corp.] HAWPO2500) Film was pasted up, immobilization of the fungus body was carried out so that the gap except putting in between two sheets, pasting up a perimeter and carrying out immobilization of the microorganism might not be generated, and the immobilized microorganism film was produced. They are 100mM(s) about this immobilized microorganism film. Phosphoric-acid buffer (pH7.0) It is immersed in inside and is an air pump. The line activated 100ml aeration for /for 3 hours. The equipment which shows the activated immobilized microorganism film to drawing 2 was equipped, and the BOD standard solution was measured.

[0022] The outline of equipment is as follows. The BOD solution extracted from the sample bottle 4 passes along a solenoid valve 5, and is led to a flow cell 7 through a pump 6. The inside of a flow cell 7 stirs by the stirring child 2 by the motor 10. The value detected with the microbial electrode 8 which consists of immobilized microorganism film 2 by which outer fitting was carried out to the electrode surface of an oxygen electrode 3 with cap 1 is amplified in the amplifier section 13, and is recorded with a recorder 14. The sample which ended measurement goes into the effluent tub 11. After measurement termination, a solenoid valve 5 is changed and it washes through a penetrant remover from the penetrant remover tub 12.

[0023] As a result of using this equipment and measuring the BOD standard solution of various concentration, as shown in drawing 3, very good straight-line relation was obtained between the concentration of BOD, and the electrical-potential-difference variation of the oxygen electrode which answers it. Next, in this equipment, it experimented by changing various capacity of a reaction vessel. Although the result was shown in Table 2, the value which converted electrical-potential-difference variation as BOD concentration based on the standard curve obtained by drawing 3 showed the measured value to the standard solution of front Naka. It was able to measure enough by the capacity of 1ml or less from the result of Table 2. When capacity was larger than 1ml, the measuring time also including washing started for a long time, when smaller than 0.3ml, detection sensitivity became low, and exact measurement was difficult.

[0024]

[Table 2]

		反応槽容量(ml)							
		0.1	0.2	0.3	0.5	0.6	1.0	2.0	5.0
標準液に対する測定値(ppm)	BOD標準液濃度(ppm)	22	10	18	21	21	22	23	21
		44	20	35	44	44	43	45	44
		66	50	58	65	66	67	66	66
		122	98	105	124	123	123	122	123
測定時間(分)		2	3	4	4	5	5	15	20

測定時間は洗浄時間も含む。

[0025] [Example 4 of an experiment] The various microorganisms cultivated and obtained by the approach of the example 1 of comparative experiments of activation time amount were fixed like the example 3 of an experiment, and it considered as the immobilized microorganism film. They are 100mM(s) about these immobilized microorganism film. Phosphoric-acid buffer (pH7.0) It is immersed in inside and is an air pump. The BOD standard solution was measured with the equipment which performs 100ml aeration for /, and is shown in drawing 2 with time. As shown in Table 3, it is Trichosporon KUTANEUMU IFO. The microorganism which belongs to Klebsiella to being required for activation in 10466 shares for one to two days, especially Klebsiella oxytoca In 12092 shares, there were the features that activation is possible in 3 hours.

[0026]

[Table 3]

	ばっ気時間(hr)							
	0	1	3	5	10	24	36	48
クレブショウ・オキトカ 12092	30	38	65	67	66	67	65	66
トリコスポロン・クタネウム IFO 10466	4	8	12	11	46	58	60	64

値は66ppm BOD標準液に対する測定値(ppm)

[0027] [Example 5 of an experiment] Example of measurement of a known reference material (comparison with Trichosporon) Klebsiella oxytoca of the example 4 of an experiment 12092 shares of immobilized microorganism film and the immobilized microorganism film of the Trichosporon KUTANEUMU stock were activated enough, the response to various reference materials was measured, and it compared with the measured value by the BOD method for five days. It carried out to measurement of the

microorganism fixed film by producing a calibration curve with the BOD standard solution using the equipment used in the example 3 of an experiment. The BOD method is JIS for five days. It carried out according to the approach of K0102 publication.

[0028] it is shown in Table 4 — as — Klebsiella oxytoca the measured value of the BOD method during five days 12092 shares of measured value is the regulating methods — good — in agreement — *** — both number of correlators — $r^2 = 0.993$ it was .

Moreover, Trichosporon KUTANEUMU IFO It is Klebsiella oxytoca of this invention also to the disaccharide as which a response was not regarded in 10466 shares. 12092 shares show a response and are [as opposed to / conversely / ethyl alcohol] Trichosporon KUTANEUMU. IFO It is Klebsiella oxytoca to 10466 shares giving the measured value for five days higher than the BOD method. 12092 shares showed the value almost equal to the BOD method for five days.

[0029]

[Table 4]

標準物質	BOD (ppm)		
	本発明法	5日間法	トリコスボロン・カタネム IFO 10466
グルコース	0.77	0.78	0.72
フルクトース	0.74	0.71	0.54
シュクロース	0.45	0.45	0.36
ラクトース	0.45	0.45	0.06
マルトース	0.53	0.50	0.03
グルタミン酸	0.56	0.56	0.70
グリシン	0.15	0.10	0.45
エタノール	0.95	0.93	2.90
酢酸	0.85	0.88	1.77

[0030] [Example 6 of an experiment] The BOD solution of various concentration was measured under arsenic existence like the example 3 of a measurement experiment under arsenic existence. Although a result is shown in drawing 4 , it is the arsenic concentration of 5000 ppm. Between BOD concentration and the electrical-potential-difference variation in an oxygen electrode, good straight-line relation was obtained also under existence. As mentioned above, according to this invention, it became clear that BOD measurement of various compounds can be performed quickly and correctly.

[0031] Next, although an example is given and explained, this invention is not limited to this example.

[0032]

[Example] Example of measurement of real waste fluid (comparison with the method during five days) Klebsiella oxytoca manufactured in the example 3 of an experiment to the equipment shown in drawing 2 It equipped with 12092 shares of activated immobilized

microorganism film, and BOD was measured about various actual waste fluid. It measured by the BOD method for five days about the sample same as a comparison. As shown in Table 5, the BOD measurement result by this invention and the measurement result of the BOD method during five days of the regulating method had high functionality.

[0033]

[Table 5]

排水試料	BOD (ppm)	
	5日間法	本発明法
養豚場	1940	1880
し尿処理放流水	24.2	20.0
浄化槽	25.7	28.2
自動車整備工場	52.6	49.0
養鶏試験場	30.3	33.8
食品製造業	49.3	39.4
水産加工業	45.6	45.2
温泉病院	60.9	60.0

[0034]

[Effect of the Invention] According to this invention, BOD in a sample can be measured quickly and correctly.

[Translation done.]

* NOTICES *

JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DESCRIPTION OF DRAWINGS

[Brief Description of the Drawings]

[Drawing 1] It is drawing showing the microbial electrode of this invention.

[Drawing 2] It is drawing showing the equipment used in the example 3 of an experiment.

[Drawing 3] It is drawing showing the result of having measured the BOD standard solution of various concentration using the equipment shown in drawing 2.

[Drawing 4] It is drawing showing the result of having measured the BOD standard solution of various concentration under arsenic existence using the equipment shown in drawing 2.

[Description of Notations]

- 1 ... Cap
- 2 ... Immobilized microorganism film
- 3 ... Oxygen electrode
- 4 ... Sample bottle
- 5 ... Solenoid valve
- 6 ... Pump
- 7 ... Flow cell
- 8 ... Microbial electrode
- 9 ... Stirring child
- 10 .. Motor
- 11 .. Effluent tub
- 12 .. Penetrant remover tub
- 13 .. Amplifier section
- 14 .. Recorder

[Translation done.]